

# 報告

## 藻類培養試験のための *Skeletonema costatum* の増殖特性試験について

岡村和雄  
(水質環境部)

### Growth Characteristics of *Skeletonema costatum* for Algal Growth Potential

Kazuo OKAMURA  
(Water Quality Division)

#### 1. はじめに

神奈川県では湖沼や海域における富栄養化問題について富栄養化対策指導指針等を策定し、積極的に栄養塩類の削減に取り組んでいるところであるが、湖沼及び海域の水質は環境基準の達成状況、アオコ及び赤潮の発生状況からみて、未だ改善の域に達していない。

富栄養化を防止するには、対象となる水域の水質を総合的には握し、それに基づいた施策を講じなければならない。

富栄養化の現状は、透明度、溶存酸素量、窒素や磷、クロロフィル a、プランクトンの種類や現存量などを調べることによってある程度は握することができる。しかしながら、富栄養化の機構を解明し、その防止対策を講じるためには、富栄養化の状態を総合的に判断できる藻類培養試験<sup>1)</sup>(以下 AGP 試験と言う)によって得られるデータが有用であると言われている。

AGP 試験は試水に含まれる種々の栄養物質を反映した潜在的な藻類生産能力をある一定の環境のもとで試験するもので、富栄養化の評価の一つの手法として最近よく用いられるようになった。AGP 試験を実際に行うには予め供試藻類の基本的な増殖特

性については握しておかなければ信頼できる結果を得ることは出来ない。

そこで、相模湾の赤潮発生時の一般的な藻類である *Skeletonema costatum* を供試藻類に選びその増殖特性の検討を行った。

#### 2. 実験方法

##### 2.1 細胞数と吸光度との相関関係

AGP 試験は藻類の最大増殖量を乾燥重量として表すこととされているが、乾燥重量を測定するには大量の試験水が必要で、藻類が最大増殖量に達したか否かをモニタリングするために乾燥重量を頻繁に測定しなくてはならない。このことは試験水が大幅に減少し、培養条件が変わるため、通常は採取量が少量で済む細胞数を計測する方法によりモニタリングを行っている。しかし、細胞数を計測するには膨大な労力と経験が必要であり、試験の効率化を考えた場合適当でない。そこで、吸光度を測定してモニタリングすることを考え、細胞数と吸光度との相関関係を求めることにした。

##### 2.1.1 試験用培養液の調製

表 1 に示す組成の f/2 保存培養液<sup>2)</sup>を用い、300ml

の三角フラスコに f/2保存培養液を150ml加え、オートクレーブで110℃15分間滅菌し、これを試験用培養液とした。

表1 f/2保存培養液の組成

化 合 物	添加量
NaNO <sub>3</sub>	60.7mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	5.03mg
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	4.3mg
Thiamine-HCl	0.1mg
Biotin	0.5 μg
VitaminB <sub>12</sub>	0.5 μg
Na <sub>2</sub> EDTA · 2 H <sub>2</sub> O	4.4mg
FeCl <sub>3</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	3.16mg
CoSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.012mg
ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.021mg
MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	0.18mg
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	0.007mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	0.007mg
人工海水	966ml
蒸留水	34ml

### 2.1.2 測定条件

継代培養した *Skeletonema costatum* を無菌的に試験用培養液に初期藻類濃度が2,000~3,000cells/mlの濃度になるように接種し、照度2,000Lux、温度20℃で培養を行い、藻類が増殖を開始してから死滅を始めるまで、原則として毎日細胞数と吸光度を測定した。

実験に先立ち吸光度測定波長を決めるために供試藻類である *Skeletonema costatum* を接種した試験用培養液について、藻類が増殖を始めてから最大増殖時に至るまでの培養期間において波長スキャンを行ったところ、680nm 付近に最大吸収波長が認められたので、吸光度の測定にはこの波長を使用することにした。

なお、使用した藻類は国立環境研究所から提供を受けた。

## 2.2 増殖特性の検討

藻類の増殖に影響を与える因子は種々あるが、本研究においてはその中で最も基本的で重要な増殖因子である照度、温度及び塩分濃度について最適な増殖条件を求めることにした。

### 2.2.1 試料の調製

f/2保存培養液中に表2に示す人工海水及び蒸留水の添加量を変えて数段階の塩分濃度の培養液を調製し、これを300mlの三角フラスコに約150ml加え、オートクレーブで110℃15分間滅菌し試験水とした。

表2 人工海水の組成

化 合 物	添加量
NaCl	23.48g
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	10.61g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3.92g
KCl	0.66g
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	1.47g
NaHCO <sub>3</sub>	0.19g
KBr	0.10g
SrCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.04g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.04g
蒸留水	1 ℓ

### 2.2.2 培養条件

#### 1) 増殖に及ぼす照度の影響

照度は2,000Lux、4,000Lux 及び6,000Lux に設定し、それぞれの照度について次の条件で培養し、増殖に及ぼす影響を調べた。

塩分濃度を20‰に調製した試験液に継代培養した *Skeletonema costatum* を初期藻類濃度が2,000~3,000cells/mlの濃度になるように無菌的に接種し、温度20℃で12時間間隔の明暗周期により培養を行い、毎日吸光度を測定した。

#### 2) 増殖に及ぼす温度の影響

温度は15℃、20℃及び25℃に設定し、それぞれの温度について次の条件で培養し、増殖に及ぼす影響を調べた。

塩分濃度を15‰に調製した試験液に継代培養した *Skeletonema costatum* を初期藻類濃度が2,000~3,000cells/mlの濃度になるように無菌的に接種し、照度2,000Lux で12時間間隔の明暗周期により培養を行い、毎日吸光度を測定した。

#### 3) 増殖に及ぼす塩分濃度の影響

塩分濃度は5‰、10‰、15‰、20‰、25‰ 及び30‰に設定し、次の条件で培養し、増殖に及ぼす影響を調べた。

6種類の塩分濃度の試験液に継代培養した

*Skeletonema costatum* を初期藻類濃度が2,000～3,000cells/mlの濃度になるように無菌的に接種し、温度20℃、照度2,000Lux で12時間間隔の明暗周期により培養を行い、毎日吸光度を測定した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 細胞数と吸光度との相関関係

試験水中の細胞数と試験水の吸光度との関係について検討した結果、図1に示すように対数増殖期の初期から安定期にかけては細胞数と吸光度の間に高い相関が認められた( $r=0.967$ )。

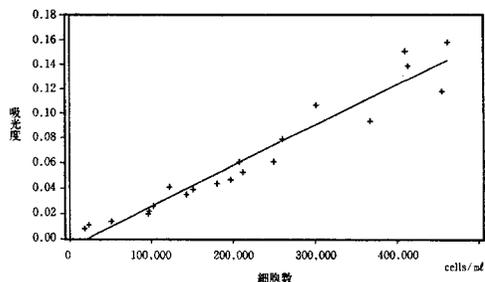


図1 細胞数と吸光度との相関関係(死滅期を除く)

しかし、死滅期まで含めると図2に示したように両者の間の相関は低くなる傾向がみられた( $r=0.822$ )。これは死滅期に入ると藻類の死滅により培養液の濁りが著しくなり、それが吸光度に影響を与えたものと思われる。

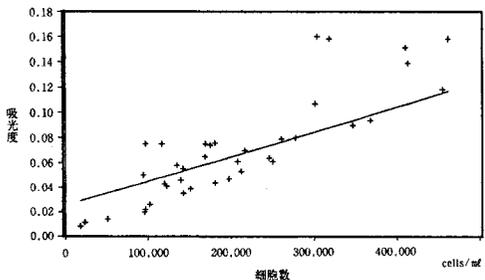


図2 細胞数と吸光度との相関関係(死滅期を含む)

しかし、藻類濃度をモニタリングする目的は最大増殖時を細胞数または吸光度により確認することであり、最大増殖時を含む安定期までは極めて相関が高いので藻類濃度を吸光度によりモニタリングしても支障ないものと判断した。

#### 3.2 増殖特性

##### 3.2.1 増殖に及ぼす照度の影響

温度を20℃の一定にして照度が2,000、4,000、6,000Lux で12時間間隔の明暗周期で照射した場合の *Skeletonema costatum* の増殖に及ぼす影響について検討し、その結果を図3に示した。

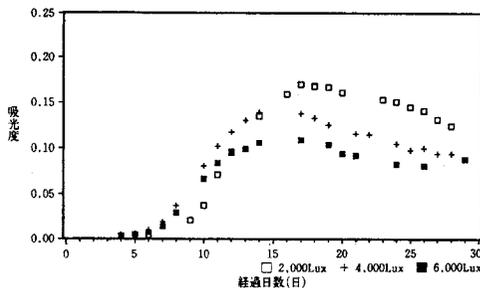


図3 照度の増殖に及ぼす影響

照度が2,000Lux 及び4,000Lux の場合は増殖量が多く良好に増殖するが、照度6,000Lux の場合は増殖量が少なく、照度が高くなると増殖量が低下することが明らかとなった。これは強光阻害により増殖が妨げられたものと思われる。

また、各照度における誘導期は、照度が2,000Lux から6,000Lux の範囲では誘導期は6～8日で、照度の変化によるはっきりとした差は認められなかった。

照度が最大増殖量に及ぼす影響は、実験した範囲においては照度が低い方が最大増殖量が多く、照度が高くなると最大増殖量が減少することが明らかになった。

以上の結果から *Skeletonema costatum* は照度が2,000～4,000Lux で良好に増殖することが判明した。

##### 3.2.2 増殖に及ぼす温度の影響

照度2,000Lux で12時間照射した場合の温度が *Skeletonema costatum* の増殖に及ぼす影響について検討し、その結果を図4に示した。

温度が20℃のときに最も増殖量が多く、15℃、25℃では増殖量が低下することがわかった。

また、各温度における誘導期は、15℃では誘導期が14日とかなり長く、20℃及び25℃では誘導期が8日と短かった。

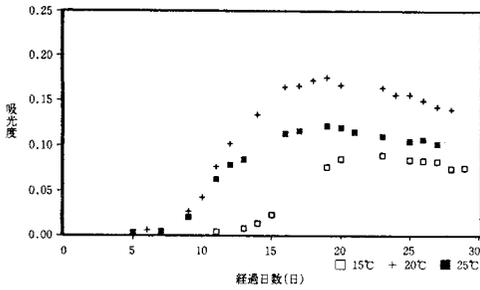


図4 温度の増殖に及ぼす影響

温度が最大増殖量に及ぼす影響は、20℃で最大増殖量がかなり多く、15℃及び25℃では少なかった。

以上の結果から温度は20℃に設定すれば十分に増殖することがわかった。

### 3.2.3 増殖に及ぼす塩分濃度の影響

塩分濃度を5、10、15、20、25及び30‰に調製したそれぞれの試験水について20℃、2,000Luxで12時間照射した場合の *Skeletonema costatum* の増殖に及ぼす影響について検討し、その結果を図5に示した。

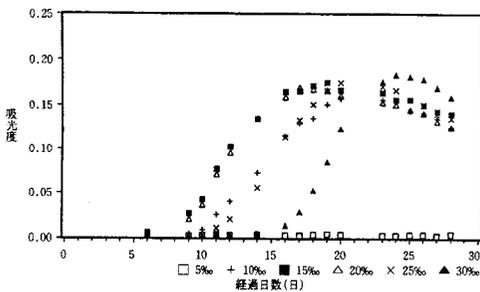


図5 塩分濃度の増殖に及ぼす影響

5‰ではほとんど増殖しなかったが、その他の塩分濃度では誘導期にはかなりの差が見られるものの、良好に増殖していた。

また、各塩分濃度における誘導期は15‰と20‰が短く、この濃度より高くても低くなくても誘導期が長くなる傾向が見られた。

なお、最大増殖量は5‰を除いて大きな変化は認められなかった。

増殖量は塩分濃度10～30‰で差は認められなかったが、誘導期については15及び20‰が短いことから、試験水を塩分濃度15～20‰に調製することが適当であると思われた。

## 4. まとめ

*Skeletonema costatum* を用いて藻類培養試験を行うための基本的な増殖特性について検討した結果、照度2,000～4,000Lux、温度20℃、塩分濃度15～20‰に試料を調製することが適当と考えられた。

## 文 献

- 1) 国立環境研究所：陸水域の富栄養化に関する総合研究(X) p1(1981)
- 2) 国立環境研究所：List of strains p36(1988)